TYPISIERUNG VON CLOSTRIDIUM DIFFICILE MIT BAKTERIOZINEN

JOSEF KLARER

Disbui. München
1987

UNI
LEOSN
BIBL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0090

Aus der Abteilung Experimentelle Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr. A. Bauernfeind)
des Max von Pettenkofer-Instituts
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. F. Deinhardt

vorgelegt über das Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

TYPISIERUNG VON CLOSTRIDIUM DIFFICILE MIT BAKTERIOZINEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
JOSEF KLARER
aus
Lengenwang

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Priv.Doz. Dr. Dr.habil. W. Klee

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

WIDMUNG

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material	9
I. Stämme	9
1. Clostridium difficile	9
2. Bakterienstämme zur Prüfung des Wirtssspektrum eines Hemmstoffs	10
3. Bakterienstämme für Kontrollzwecke bei der Prüfung auf Trypsinstabilität der Hemmstoffe von Cl. difficile	10
II. Medien und Reagenzien	11
1. Nährmedien	11
2. Reagenzien	12
III. Geräte	13
C. Methoden	14
I. Identifikation der Clostridium difficile-Stämme	14
II. Mitomycin C-Empfindlichkeit von Cl. difficile-Stämmen	15
III. Ermittlung von hemmstoff-produzierenden und hemmstoff-sensiblen Stämmen bei Cl. difficile	17
1. Hemmstoffsynthese auf festem Medium und ihr Nachweis (Multipoint-Inoculator-Methode)	17
2. Hemmstoffsynthese in flüssigem Medium	19
a) Nachweis von Hemmstoffen in Kulturüberständen mittels Indikatorsoftagarsystem	19
b) Anreicherung der Hemmstoffe durch Ultrazentrifugation	21
c) Trypsin und seine Wirkung auf die Hemmstoffe von Cl. difficile	22

Seite

IV. Charakterisierung der Hemmstoffe 23

1. Wirtsspezifität der Hemmstoffe von Cl. difficile 23
2. Sensibilität gegenüber Wärmeeinwirkung 23
3. Sensibilität gegenüber Trypsin 24
   a) Bei Hemmstoffen aus flüssigem Medium 24
   b) Bei Hemmstoffen auf festem Medium 24
4. Ausschluß von Bakteriophagen 25
5. Sedimentationsverhalten (Saccharosegradient) 26

V. Der Einfluß von Trypsin auf die Wirkung der Hemmstoffe 28

D. Ergebnisse 30

I. Mitomycin C-MHK und Wahl der Mitomycinkonzentration zur Induktion der Hemmstoffsynthese 30

II. Hemmstoff-produzierende und hemmstoff-sensible Stämme bei Cl. difficile 33

1. Hemmstoffsynthese auf festem Medium 33
2. Hemmstoffsynthese in flüssigem Medium 33
   a) In flüssigem Medium synthetisierte Hemmstoffe (nicht angereichert) 33
   b) In flüssigem Medium synthetisierte, 20-fach angereicherte Hemmstoffe 34
   c) Der Einfluß von Trypsin auf die Wirkung der Hemmstoffe 35

III. Charakterisierung der Hemmstoffe von Cl. difficile 53

1. Wirtsspezifität der Hemmstoffe von Cl. difficile 53
2. Sensibilität gegenüber Wärmeeinwirkung 53
3. Sensibilität gegenüber Trypsin 54
   a) Bei Hemmstoffen aus flüssigem Medium 54
   b) Bei Hemmstoffen auf festem Medium 55
4. Ausschluß von Bakteriophagen 57
5. Sedimentationsverhalten 57

IV. Die Rolle von Trypsin bei der Wirkung der Hemmstoffe 59

Seite

E. Diskussion 62

F. Zusammenfassung 72
Summary 74

G. Literaturangaben 76

Verzeichnis der Tabellen

		Seite
Tab. 1:	Mitomycin-MHK von 22 Cl. difficile-Stämmen	31
Tab. 2:	Hemmstoff-produzierende und hemmstoff-sensible Stämme bei Cl. difficile (n = 34)	34
Tab. 3:	Verteilung der "Trypsin"-Typen den Producern (n = 46)	36
Tab. 4:	Hemmstoff-produzierende Stämme bei Cl. difficile (n = 144)	38
Tab. 5:	Wärmeempfindlichkeit des Hemmstoffs 232	54
Tab. 6:	Trypsinempfindlichkeit des Hemmstoffs 232 in flüssigem Medium	55
Tab. 7:	Trypsinempfindlichkeit des Hemmstoffs 232 auf festem Medium	56
Tab. 8:	Trypsinempfindlichkeit des Bakteriozins K1	56
Tab. 9:	Trypsinempfindlichkeit des Bakteriozins J5	57
Tab. 10:	Saccharosegradient des Hemmstoffs 232	58
Tab. 11:	Die Wirkung von Trypsin bei Producer 797	60
Tab. 12:	Die Wirkung von Trypsin bei Producer 906	60

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Mitomycin C-MHK bei Cl. difficile (n = 22)	32

A. EINLEITUNG

Die Vertreter des Genus Clostridium sind gram-positive, anaerobe bzw. aerotolerante sporenbildende Stäbchen, die weitverbreitet (Boden, Abwasser) vorkommen.

Seit 1977 wird Clostridium difficile als Ursache für die antibiotika-assoziierte pseudomembranöse Colitis (PMC) diskutiert (18). Die Krankheit wurde schon um die Jahrhundertwende als postoperative Komplikation nach Gastro-Enterostomien beschrieben (45). Charakteristisch an ihr ist die akute Colitis. Pseudomembranen können ausgedehnt sein, aber oft treten nur kleine, leicht abnehmbare gelb-weiße Plaques oder Knötchen auf. Sie bestehen aus Fibrin, Schleim, nekrotischen Epithelzellen sowie Leukozyten, und sie sind lose mit dem entzündeten Colon verbunden. Nur ca. 20% der Patienten mit antibiotika-assoziierter Diarrhoe erkranken an Colitis. Die Ursachen des weniger gefährlichen Typs der antibiotika-assoziierten Diarrhoe sind nicht bekannt (16).

Die Diagosestellung der PMC hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Neben der Isolierung von Cl. difficile und dem Toxinnachweis aus dem Stuhl stellen die Rektoskopie sowie die Bariumeinlaufradiographie wichtige Bestandteile der Diagnose dar (19).

Die Anzüchtung von Cl. difficile aus dem Stuhl erfolgt auf

Na-Taurocholat-Cycloserin-Cefoxitin-Fructose-Agar (TCCFA) (10,49), die anschließende Identifikation durch Gas-Flüssig-Chromatographie, wobei die Produktion von Capronsäure und p-Cresol in einem definierten Medium nachgewiesen wird (35), durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (22) oder konventionell mit dem API 20A- System für Anaerobier, wofür allerdings eine 48stündige Inkubation notwendig ist (21). Von R. H. Yolken et al. wurde ein EIA (= enzyme immunoassay) zum Nachweis von Cl. difficile-Antigen entwickelt (52). K. H. Wilson et al. verwenden dafür einen Fluoreszenz-Antikörper-Test (50).

Zum Nachweis der Cl. difficile-Toxine A und B im Stuhl (wobei A ein Enterotoxin und B ein Zytotoxin ist) wurden mehrere Verfahren entwickelt. Eine der ältesten und zuverlässigsten Methoden zum Nachweis von Toxin B ist der Zellkulturassay (12). Dabei kann das Cl. difficile-Toxin B durch ein Cl. sordellii-Antitoxin neutralisiert werden (27). Andere Autoren verwenden für den Toxinnachweis die Gegenstromelektrophorese (= CIE) (47). Bei Vergleich dieser beiden Vefahren (29) wurde festgestellt, daß die CIE außer auf Toxine auch noch auf andere Antigene von Cl. difficile reagiert und somit nicht ausreichend spezifisch ist (48). Toxin A kann mit einem Hasendünndarmschlingentest nachgewiesen werden (31). Ein indirekter ELISA steht seit 1983 zum quantitativen Nachweis von Toxin A im Stuhl zur Verfügung

(32). Der Nachweis von Antikörpern im Serum gegen Toxin A und B mittels ELISA wird ebenfalls beschrieben (46). Dies setzt eine biochemische und immunologische Trennbarkeit der beiden Toxine voraus (30).

Als wichtigste, wenn nicht gar alleinige Ursache für das Auftreten einer antibiotika-assoziierten Colitis gilt das Überwuchern von Cl. difficile im Darmlumen als Folge einer gegenwärtigen oder vorausgegangenen Antibiotika-Therapie (14). Die dafür relevanten Experimente wurden an Hamstern (39) und Kaninchen (25) durchgeführt. Bei ihnen läßt sich eine fast immer tödliche Entzündung der Darmschleimhaut durch orale oder parenterale Applikation von Lincomycin bzw. Clindamycin erzeugen.

Die Enterocolitis der Hamster und Kaninchen ist durch Inoculation von Darminhalt oder seines zellfreien Filtrats auf den Darm gesunder Tiere übertragbar. Sie wird durch die Toxine A und B hervorgerufen und kann beim Hamster sowohl durch aktive Immunisierung mit Toxoid, hergestellt aus Toxin A und B (16), als auch durch passive Immunisierung mit Antitoxin gegen Cl. sordellii verhindert werden (2). Prophylaktische Gaben von Vancomycin beugen der Entstehung einer Enterocolitis vor (3). Andere Versuche haben gezeigt, daß bei Hamstern durch eine Kolonisation mit nicht toxinbildenden Cl. difficile-Stämmen eine Infektion mit toxinbildenden Stämmen verhindert werden kann (8,51).

Bei einer antibiotischen Therapie wird die Möglichkeit einer Schädigung der normalen Bakterienflora des Gastrointestinaltraktes diskutiert, die ihrerseits eine Kolonisation und/oder Proliferation durch Cl. difficile ermöglicht. Hinweise dafür liefern in vitro-Beobachtungen, die eine antagonistische Aktivität von Lactobakterien und Enterokokken gegenüber Cl. difficile zeigen. Cl. difficile seinerseits unterdrückt das Wachstum einzelner Stämme der Genera Bacteroides, Peptococcus und Peptostreptococcus (37). Clindamycin und Cephaloridin stimulieren die Produktion von Toxin A und B bei Cl. difficile um das 2-16fache (24).
Cl. difficile wird auch als Ursache unkomplizierter, milder Diarrhoen angesehen, kann aber auch eine schwere Pancolitis oder akutes Abdomen auslösen (28,43). Als wichtigste Punkte bei der Therapie gelten: Sofortiges Absetzen des Antibiotikums, unterstützende Maßnahmen wie Flüssigkeits- und Elektrolytzufuhr sowie Applikation von Metronidazol oder Cholestyramin. In schweren Fällen und bei älteren Patienten wird zusätzlich zu Metronidazol Vancomycin und Bacitracin verabreicht (15,16,17). Metronidazol und Vancomycin gelten in der Therapie als gleichwertig (42).
Bei ca. 3-5% der gesunden Erwachsenen kann Cl. difficile aus dem Stuhl isoliert werden. Höhere Raten bis zu 15% oder mehr symptomloser Träger werden bei hospitalisierten Erwachsenen gefunden. Bemerkenswert hoch ist die Trägerrate von Cl.

difficile bei Neugeborenen und Kleinkindern bis zu zwei Jahren, wo sie bis zu 63% beträgt (23). Die Isolationsrate von Cl. difficile bei Säuglingen ist signifikant an das Alter gebunden, wobei das Maximum zwischen 1 und 8 Monaten liegt. Auf einer Entbindungsstation wurden Vaginal- und Cervicalabstriche der werdenden Mütter kurz vor der Enbindung sowie Stuhlproben von Säuglingsschwestern auf Cl. difficile untersucht. Alle Proben waren negativ. Dagegen waren 9% der aus der Umwelt genommenen Proben positiv. Daher muß davon ausgegangen werden, daß sich die Neugeborenen während ihres Krankenhausaufenthalts progressiv Cl. difficile aus der Umwelt aneignen (1). Aus bis jetzt unbekannten Gründen führt dies bei Säuglingen nicht zu einer Erkrankung (16). Als Ursache ihres Gesundbleibens wird eine erst passive, später aktive Immunisierung diskutiert (23).
Die antibiotika-assoziierte Enterocolitis tritt am häufigsten und mit den schwersten Verlaufsformen bei Patienten über 60 Jahren, bei Frauen, bei Patienten mit abdominalen Neoplasmen, bei vorausgegangenen Bauchoperationen und während einer Antibiotika-Therapie auf (15). Es gibt deutliche Hinweise auf eine Infektiosität der antibiotika-assoziierten Enterocolitis. Eines der wichtigsten Verdachtsmomente für die Infektiosität ist das örtlich und zeitlich gehäufte Auftreten dieser Krankheit. C. Greenfield berichtet über einen Ausbruch von PMC, bei dem acht Patienten zweier

benachbarter Stationen innerhalb von 11 Tagen erkrankten. Bei Identifizierungsversuchen ergaben sich im Fermentationsmuster und bezüglich der Antibiotikaresistenz keine bedeutenden Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten (20). D. W. Burdon berichtet von 130 Cl. difficile-Isolaten, die innerhalb von vier Jahren in einem Krankenhaus gesammelt wurden. 95 davon waren aus zwei benachbarten chirurgischen Stationen mit zusammen 21 Betten. Die übrigen 35 Isolate stammten aus den restlichen Stationen (360 Betten). Viele der Isolate waren resistent gegenüber Clindamycin, Tetracyclin und Rifampicin. Diese Dreifachresistenz wurde für einen geeigneten epidemiologischen Marker gehalten, da nur eines von 53 Isolaten aus anderen Krankenhäusern das selbe Resistenzmuster aufwies (11).

Im Tierversuch zeigte sich, daß mit Vancomycin vorbehandelte Hamster signifikant öfter an Enterocolitis erkrankten, wenn sie sich in einem konventionellen Raum aufhielten als in einem sterilen und isolierten Raum. Im konventionellen Raum konnte Cl. difficile in Proben von Käfigen, Futternäpfen, Böden, Eimern und von den Händen der Pfleger nachgewiesen werden. Kreuzinfektionen spielen hier wahrscheinlich in der Pathogenese der antibiotika-assoziierten Enterocolitis bei Hamstern eine wichtige Rolle (44).

Untersuchungen über die Verbreitung von Cl. difficile in Krankenhäusern zeigen ein Vorkommen von 9,3% bei über 900

Proben, die aus der Umgebung von Cl. difficile-positiven Trägern genommen wurden. Demgegenüber steht ein Vorkommen von 2,6% bei 500 Proben aus Stationen, in denen kein Cl. difficile-Träger bekannt war.

Auf Fußböden ausgebrachte Cl. difficile-Kulturen lassen sich noch nach 5 Monaten nachweisen (26). Dieses Phänomen ist hygienisch und epidemiologisch von großer Bedeutung.

Als potentielles Erregerreservoir gelten auch Hunde und Katzen, bei denen Trägerraten von 20 - 30% gefunden wurden. Gastrointestinale Störungen zeigten sich bei ihnen nicht. Die meisten der von ihnen isolierten Stämme bildeten keine Toxine. Unter den toxinbildenden befanden sich jedoch auch Stämme, die sich in einem für die menschliche PMC aufgestellten Tierversuch als pathogen erwiesen (7).

Die Epidemiologie der antibiotika-assoziierten Diarrhoe ist noch lange nicht geklärt. Es gibt Hinweise darauf, daß Cl. difficile sowohl durch das Pflegepersonal als auch durch gemeinsam benutzte hygienische Einrichtungen und Gebrauchsgegenstände übertragen wird.

Mit einem Typisierungsverfahren, das auf der radioaktiven Markierung des Schwefels im Methionin-Stoffwechsel beruht, konnte erstmals nachgewiesen werden, daß die Cl. difficile-Isolate aus dem Stuhl eines Patienten und aus seiner Umgebung dem selben Typ angehörten. Das ist ein wichtiger Hinweis für Kreuzinfektionen zwischen Patienten und für den

Erregererwerb im Krankenhaus (40). Die daraus resultierende Konsequenz wäre eine Verlegung der PMC-Patienten in Isolierstationen (11).

Die Serotypisierung bringt bei Cl. difficile keine entscheidenden Aufschlüsse über die Epidemiologie. Es lassen sich damit bestenfalls toxinproduzierende von nicht toxinproduzierenden unterscheiden (13).

Bakteriophagen (34,36) und Bakteriozine (33,41) wurden schon bei vielen Clostridienspezies beschrieben. 1983 wurde ein kombiniertes Typisierungsverfahren, basierend auf Bakteriophagen und Bakteriozinen, für Cl. difficile entwickelt (38).

Diese beiden bis jetzt für Cl. difficile bekannten Typisierungsverfahren finden jedoch nur wenig Anwendung. Ursachen sind der Umgang mit radioaktiven Substanzen, mangelnde Typisierbarkeit und Reproduzierbarkeit sowie aufwendige Durchführung.

Die Bakteriozinotypie hat sich bei einer Reihe von gramnegativen Spezies als gut praktikable und zuverlässige Methode der Typisierung erwiesen. Bislang ist diese Möglichkeit für Cl. difficile nicht befriedigend untersucht worden. Diese Arbeit hat sich deshalb zum Ziel gesetzt, das Vorkommen von Bakteriozinen in dieser Spezies systematisch zu analysieren und deren Einsatzmöglichkeit für die Typisierung zu verbessern.

B. MATERIAL

I. Stämme

1. Clostridium difficile

- Statens Bakteriologiska Laboratorium, Stockholm (C. E. Nord):
  22, 39, 49, 67, 68, 73, 83, 88, 91, 92, 94, 103, 139, 187, 232, 234, 246, 253, 298, 299, 305, 347, 581, 582, 583, 584, 585, 598, 599, 602, 603, 604, 605, 606, 611, 612, 616, 617, 628, 629, 640, 643, 655, 669, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 682, 690, 699, 700, 701, 702, 706, 714, 721, 722, 726, 749, 750, 752, 756, 757, 764, 770, 772, 778, 779, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 794, 795, 797, 798, 799, 801, 804, 805, 806, 808, 809, 813, 815, 816, 826, 836, 849, 850, 855, 856, 864, 869, 871, 876, 888, 902, 903, 904, 906, 909, 915, 1047, 1049, 1100, 1104, 1121, 1122, 1123
- Max von Pettenkofer-Institut, München (A. Bauernfeind):
  21104a,, 21104b, 21516, 21533
- Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Linz (H. Mittermayer):
  15763, 16170, 16249, 16476

- Zentrum der Hygiene; Abteilung für medizinische Mikrobiologie, Frankfurt/Main (H. Knothe):
  F6, F7, F9, F10, F11, F12
- Medizinaluntersuchungsamt, Abteilung für medizinische Mikrobiologie der Universität Kiel (U. Ullmann):
  5c, 41, 53, 55, 57, 131, 134, 136, 137, 139, 637, 645

2. Bakterienstämme zur Prüfung des Wirtsspektrum eines Hemmstoffs

- Abteilung für experimentelle Mikrobiologie am Max von Pettenkofer-Institut, München:
  Bacteroides (B.) vulgatus P.B., B. vulgatus Bremerhaven 5097/2, B. fragilis I, B. fragilis II, B. fragilis 2151, B. thetaiotaomicron 2079, B. thetaiotaomicron 2255, B. distasonis, Peptococcus 20357T, Peptoc. 20362, Peptoc. 20470, Clostridium (Cl.) sordellii, Cl. sporogenes

3. Bakterienstämme für Kontrollzwecke bei der Prüfung auf Trypsinstabilität der Hemmstoffe von Cl. difficile

- Klebsiella pneumoniae K1, K61 (I. Ørskov, Kopenhagen)
- Providencia rettgeri J5, J38 (S. Namioka, Tokio)

II. Medien und Reagenzien

1. Nährmedien

- Frischblutagar
  Zusammensetzung (42 g/l aqua dest):
  25 g Pepton aus Fleisch (E. Merk), 3 g NaCl, 2 g K_2HPO_4,
  12 g Bacto-Agar; 10% defibriniertes Schafsblut;
  pH 7,4.
- Clostridium Difficile Agar Base mit 7% defibriniertem Pferdeblut, Oxoid Deutschland, Wesel
- Clostridium Difficile Bouillon:
  CD-Agar Base ohne Blut, mit 0,05% Agar
- BHIGT-Broth, Difco Laboratories, Detroit, Michigan
  Zusammensetzung (48 g/l aqua dest):
  37 g Brain Heart Infusion, 10 g Glucose,
  1 g Na-thioglycolat.
- BHIGT-Softagar = BHIGT-Broth + 0,55% Bacto-Agar,
- BHIGT-Agar = BHIGT-Broth + 1,5 % Bacto-Agar,
  Softagar und Agar werden 7% defibriniertes Pferdeblut zugesetzt.

2. Reagenzien

- Mitomycin C, Boehringer, Mannheim,
- Methanol pro analysi, Merck, Darmstadt,
- Chloroform pro analysi, Merck, Darmstadt,
- Saccharose zur Dichtegradientenzentrifugation, Merck, Darmstadt,
- Trypsin, lyophilisiert, salzfrei, Sigma, Taufkirchen,
- Thioglycolic acid - Sodium salt, Sigma, Taufkirchen,
- Phosphatpuffer 0,06 M, pH 6,8 (50 Vol% KH_2PO_4-Lösung 1/15 M, 50 Vol% $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$-Lösung 1/15 M)

III. Geräte

- Corning Colorimeter 252 zur Messung der optischen Dichte (OD) von Bakteriensuspensionen bei 600 nm (OD 100 $\hat{=}$ 10^8 Koloniebildner/ml),
- Gilford Spectrophotometer 240 zur Messung der Mitomycin C-Konzentration bei 360 nm,
- Denley Multipoint-Inoculator zum Auftragen der Producer auf die Agarmedien,
- Vorrichtung zum Mischen der Dichtegradienten, Hölzel Technik, Dorfen,
- Zentrifugen:
  Labofuge GL, Heraeus Christ, Osterode,
  Kontron Unltrazentrifuge TGA, Kontron Instruments, Eching mit 3 Rotoren: TFT 65.13, TI 65, SW 50.1
- Gas-Generating-Kit-System für die Anaerobierdiagnostik, Oxoid Deutschland, Wesel:

Anaerobiertopf	Art. Nr. HP 11
Gas-Generating-Kit	Art. Nr. BR 38
Anaerobierindikatoren	Art. Nr. BR 55
Sicherheitskatalysatoren	Art. Nr. BR 42

C. METHODEN

I. Reinkultur der Clostridium difficile-Stämme

Die Cl. difficile-Stämme wurden von den Versandmedien zuerst auf Frischblutagar ausgestrichen und für 48 h anaerob bei 37°C bebrütet.
Die Identifikation und das Anlegen einer Reinkultur für die Konservierung in flüssigem Stickstoff erfolgte aufgrund der charakteristischen Koloniemorphologie, die Cl. difficile auf diesem Medium besitzt.
Von allen Stämmen wurde ein Gram-Präparat hergestellt und auf gram-positive Stäbchen mit subterminalen Sporen untersucht.

II. Mitomycin C-Empfindlichkeit von Cl. difficile-Stämmen

Die Bestimmung der Mitomycin C-Empfindlichkeit ist notwendig, um herauszufinden, welche Mitomycinkonzentration dem Nährmedium zur Induktion der Hemmstoffsynthese zugesetzt werden kann, ohne die Stämme am Wachstum zu hindern. Als Maß für die Mitomycin-Empfindlichkeit diente die MHK (= minimale Hemmkonzentration). Dem flüssigen Agar (CD-Agar von Oxoid mit 7% defibriniertem Pferdeblut) wurde bei 50 - 55°C aus einer Stammlösung Antibiotikum in der gewünschten Konzentration zupipettiert. 20 ml Agar wurden in jede Petrischale (Durchmesser = 8,5 cm) gefüllt.

Zur Herstellung der Mitomycin C-Stammlösung wird der Inhalt eines Fläschchens (ca. 2 mg) in 4 ml Methanol gelöst. Wegen der starken Schwankung der tatsächlichen Konzentration muß die aktuelle Aktivität der Substanz in der Stammlösung photometrisch bestimmt werden. Die Konzentration läßt sich mit Hilfe der gemessenen Extinktion berechnen. Hierbei entspricht eine Extinktion von 742 bei 360 nm einer Mitomycin C-Konzentration von 10 mg/ml.

Auf die vorgefertigten CD-Agarplatten mit unterschiedlichen Mitomycin C-Konzentrationen wurden die zu testenden Stämme mit einem Multipoint-Inoculator aufgebracht. Dabei ist zu beachten, daß die Stifte des Multipoint-Inoculators vor jedem Wechsel auf Medien mit einer anderen Mitomycin C-

Konzentration gespült, ausgeglüht und wieder abgekühlt werden.

Zur Herstellung des Inoculums wurden 24 h alte Reinkulturen in CD-Bouillon eingerieben und photometrisch auf eine optische Dichte (OD) von 1000 eingestellt, was einer Koloniebildnerkonzentration (KB) von ca. 10^9 KB/ml entspricht. Diese Suspension wurde zusätzlich 1:100 (≙ 10^7 KB/ml) mit CD-Bouillon verdünnt.

Die Ermittlung der MHK wurde parallel mit zwei verschiedenen Koloniebildnerzahlen pro Impfpunkt durchgeführt. Jeder Stift des Multipoint-Inoculators überträgt nach dem Eintauchen in die Bakteriensuspension ca. 1,5 µl auf die Agarplatte. Hierbei entspricht also das Eintauchen in die Suspension mit OD 1000 einer aufgebrachten Koloniebildnerzahl von ca. 10^6, und das Eintauchen in die 1:100 verdünnte Suspension (= OD 10) einer Koloniebildnerzahl von ca. 10^4.

Die Medien wurden 48 h bei 37°C anaerob bebrütet.

Abgelesen wird nur, wenn die Bakterienstämme auf den Kontrollplatten ohne Mitomycin C gewachsen sind. Die MHK ist diejenige Mitomycin-Konzentration, bei der nur noch einzelne Kolonien oder Schatten im Bereich der Impfpunkte zu erkennen sind.

III. Ermittlung von hemmstoff-produzierenden und hemmstoff-sensiblen Stämmen bei Cl. difficile

1. Hemmstoffsynthese auf festem Medium und ihr Nachweis (Multipoint-Inoculator-Methode)

Für die Typisierungsversuche wurden Petrischalen (Ø 8,5 cm) verwendet. Als Nährmedium wurde Brain-Heart-Infusion-Glucose-Na-thioglycolat (BHIGT)-Agar mit Zusatz von 7% defibriniertem Pferdeblut verwendet.
Zu Beginn der Experimente war das Verhältnis von hemmstoff-produzierenden zu hemmstoff-sensiblen Stämmen bei Cl. difficile nicht abzuschätzen. Deshalb wurden grundsätzlich alle Stämme einerseits als potentielle Producer, andererseits als potentielle Indikatoren getestet.

- Nachweis von Hemmstoffproduktion.

Die Reinkultur eines 24 h alten Stammes wurde in BHIGT-Bouillon auf OD 1000 eingerieben. Von dieser Suspension wurden zweimal 1,5 µl, also ca. $3x10^6$ KB pro Impfpunkt auf die BHIGT-Agarplatte mit 0,06 µg/ml Mitomycin C aufgebracht. Die so beimpften Medien wurden 24 h lang bei 32°C im Anaerobiertopf bebrütet.
Um das Wachstum der potentiellen Producer nach 24 h zu

stoppen, wurden die Platten 30 min lang chloroformiert (4) und anschließend für mindestens 45 min ausgelüftet. Wenn ein Hemmstoff synthetisiert worden ist, befindet er sich im Agar, in den er durch Diffusion gelangt ist.
Um eine eventuelle Synthese eines Hemmstoffs nachweisen zu können, wurden die auf diese Weise behandelten Producer mit einem empfindlichen Indikatorstamm überschichtet.

- Nachweis der Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen.

Hierbei wurde wie beim Producer eine 24 h alte Vorkultur verwendet, die in BHIGT-Bouillon auf OD 500 eingerieben worden war. Von dieser Indikatorbakteriensuspension wurden 0,5 ml mit 4 ml BHIGT-Softagar vermischt (Koloniebildnerzahl ca. $2,5 \times 10^8$). Dabei ist darauf zu achten, daß die Temperatur des Softagars beim Mischen mit der Bakteriensuspension nicht höher als 50°C ist. Der Softagar wurde dann auf die in oben beschriebener Weise behandelten Medien luftblasenfrei ausgegossen. Sobald der Softagar fest geworden war, wurden die Medien für 24 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bebrütet.

Bei der Auswertung wurde folgende Klassifizierung durchgeführt:

1. Der Indikatorrasen ist über dem Impfpunkt des Producers vollständig im Wachstum gehemmt = + (positiv)
2. Der Indikatorrasen wächst homogen = - (negativ)
3. Der Indikatorrasen ist über dem Impfpunkt des Producers um mindestens 50% ausgedünnt oder netzartig aufgerissen = +/- (als positiv bewertet)
4. Der Indikatorrasen wächst nicht oder nur in Form von Einzelkolonien = nicht auswertbar.

2. Hemmstoffsynthese in flüssigem Medium

a) Nachweis von Hemmstoffen in Kulturüberständen mittels Indikatorsoftagarsystem.

- Hemmstoffsynthese.

Bei dieser Methode wurde BHIGT-Bouillon ohne Zusatz von Blut verwendet. Die 24 h auf BHIGT-Agarmedium bebrütete Vorkultur wurde in BHIGT-Bouillon auf eine OD von 100 - 150 eingerieben. Dieser Suspension wurde Mitomycin in einer Konzentration von 0,13 µg/ml zugesetzt. Als Kulturgefäße wurden Erlenmayerkolben verwendet, die maximal bis zur Hälfte des jeweiligen Nutzvolumens gefüllt waren. Die Kulturgefäße

wurden mit Alufolie so abgedeckt, daß ein Gasaustausch zwischen Gefäßinhalt und umgebender Atmosphäre gut möglich war. Die Bebrütung erfolgte im Anaerobiertopf bei 32°C für 42 h. Anschließend wurde die Suspension chloroformiert, d. h. ungefähr 1 Minute lang mit Chloroform, das im Verhältnis 1:3 dazugegeben wurde, gut geschüttelt und 15 min lang bei 3000 min^{-1} zentrifugiert. Anschließend wurden ca. 8 - 10 µl des so gewonnenen Überstandes auf einen in eine BHIGT-Agarplatte ausgegossenen Indikatorsoftagar aufgetropft. In der Zeit zwischen Zentrifugation und Auftropfen wurde der Kulturüberstand im Kühlschrank aufbewahrt, er wurde jedoch stets am selben Tag weiterverarbeitet.

- Hemmstoffnachweis.

Von einer 24 h alten Vorkultur auf BHIGT-Agar wurde der Indikatorstamm in 1 ml BHIGT-Bouillon auf eine OD von ca. 4000 eingerieben ($4x10^9$ KB/ml). Zu dieser Suspension wurden 4 ml BHIGT-Softagar gegeben, geschüttelt und auf eine BHIGT-Agarplatte ausgegossen. Nach dem Festwerden des Softagars wurde der aufbereitete Kulturüberstand aufgetropft und für 24 h bei 37°C im Anaerobiertopf bebrütet.

Die Ergebnisse wurden folgendermaßen klassifiziert:

1. Der Indikatorrasen ist an der Auftropfstelle vollständig im Wachstum gehemmt = + (positiv)
2. Der Indikatorrasen wächst homogen = - (negativ)
3. Der Indikatorrasen ist an der Auftropfstelle um mindestens 50% ausgedünnt oder netzartig aufgerissen = +/- (als positiv bewertet)
4. Der Indikatorrasen wächst nicht oder nur in Form von Einzelkolonien = nicht auswertbar.

b) Anreicherung der Hemmstoffe durch Ultrazentrifugation.

Die wie oben angegeben präparierten Kulturüberstände wurden in Ultrazentrifugenröhrchen abgefüllt und eine Stunde lang bei 140 000 g zentrifugiert. Diese g-Zahl wird je nach Rotortyp bei 45 000 min^{-1} (TFT 65.13 für Röhrchen mit 11 ml) oder bei 46 000 min^{-1} (TI 65 für Röhrchen mit 35 ml) erreicht. Während des Zentrifugenlaufs wurde auf 4°C gekühlt. Pro Zentifugation wurde maximal auf das 20-fache angereichert, d. h. aus dem Zentrifugenröhrchen wurde 19/20 des Volumens vorsichtig abgehebert. Mit dem verbleibenden Rest wurde das Sediment vollständig resuspendiert. Dieses Lysat kann nun entweder weiter angereichert werden, indem man mit entsprechenden Mengen wie oben verfährt, oder es wird weiter aufbereitet. Bei der Weiterverarbeitung wurde

das Lysat mit Chloroform im Verhältnis 1:3 gemischt, gut geschüttelt und 15 min lang bei 3000 min^{-1} zentrifugiert, da die Anreicherung durch Ultrazentrifugation nicht unter sterilen Kautelen durchgeführt werden kann.
Dann wurde der theoretische Anreicherungsfaktor überprüft. Ein 100-fach angereichertes Lysat wurde mit BHIGT-Bouillon 1:10, 1:100, 1:1000 verdünnt und auf einen Indikatorsoftagar aufgetropft. Als Titerkontrolle diente ein nicht angereichertes Lysat.

c) Trypsin und seine Wirkung auf die Hemmstoffe von Cl. difficile.

Jeweils die Hälfte des 20-fach angereicherten Lysats wurde mit 100 µg/ml Trypsin versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde mit dem unbehandelten und mit dem trypsin-behandelten Lysat parallel verfahren. Je 8 - 10 µl wurden auf einen Indikatorsoftagar aufgetropft. Die Medien wurden für 24 h bei 37°C im Anaerobiertopf bebrütet. Das Ablesen wird erleichtert, wenn man die Indikatorrasen über Nacht bei Zimmertemperatur stehen läßt, damit die Softagarschicht abtrocknen kann.

IV. Charakterisierung der Hemmstoffe

Ausgangsmaterial war ein 100-fach angereichertes Lysat aus Flüssigkulturen. Die Empfindlichkeit gegenüber Trypsin wurde auch auf festem Medium untersucht.

1. Wirtsspezifität der Hemmstoffe von Cl. difficile

Ein 100-fach angereichertes Lysat wurde auf Indikatorsoftagarplatten aufgetropft (Methodik s. o.). Als Indikatoren dienten verschiedene Anaerobierspezies, darunter gram-positive und gram-negative Stäbchen sowie gram-positive Kokken (s. Material: Sämme 2.).
Als Kontrolle wurde ein sensibler Cl. difficile-Stamm verwendet. Alle Medien wurden 24 h bei 37°C im Anaerobiertopf bebrütet.

2. Sensibilität gegenüber Wärmeeinwirkung

100 µl eines 100-fach angereicherten Lysats wurden in sterile Eppendorfröhrchen abgefüllt und 30 min lang im Wasserbad einer konstanten Temperatur ausgesetzt. Aus den einzelnen Röhrchen wurden nach Abkühlen auf 4°C je 8 - 10 µl auf drei verschiedene sensible Indikatorsaftagarrasen aufgetropft. Als Kontrolle diente ein nicht erhitztes Lysat.

Folgende Temperaturstufen wurden gewählt:
45° - 50° - 55° - 60° - 65° - 70° - 80° - 90° - 100°C
Die Indikatorsoftagarplatten wurde für 24 h bei 37°C anaerob bebrütet.

3. Sensibilität gegenüber Trypsin

a) Bei Hemmstoffen aus flüssigem Medium.

100-fach angereichertes Lysat wurde mit Trypsin in Konzentrationen von 50, 100 und 200 µg/ml versetzt. Die Proben wurden geschüttelt und eine Stunde lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurden von jeder Trypsinkonzentration 8 - 10 µl auf drei verschiedene Indikatorsoftagarrasen aufgetropft. Als Kontrolle diente unbehandeltes Lysat. Die Medien wurden 24 h bei 37°C im Anaeobiertopf bebrütet.

b) Bei Hemmstoffen auf festem Medium.

BHIGT-Agar wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C 7% defibriniertes Pferdeblut, 0,06 µg/ml Mitomycin C und 50 µg/ml Trypsin hinzugefügt. Um dabei eine eventuelle Wechselwirkung zwischen Mitomycin und Trypsin erkennen zu können, wurden Platten in vier verschiedenen Kombinationen

der genannten Medienanteile gegossen:

- 20 ml BHIGT-Agar
- 20 ml BHIGT-Agar + 0,06 µg/ml Mitomycin C
- 20 ml BHIGT-Agar + 0,06 µg/ml Mitomycin C
  + 50 µg/ml Trypsin
- 20 ml BHIGT-Agar + 50 µg/ml Trypsin

Als Positivkontrolle, d. h. als Beweis für die Wirksamkeit des Trypsins gegen ein Bakteriozin, diente das als Protein bekannte Bakteriozin des Klebsiella pneumoniae-Stammes K1, das auf allen Medien mit Trypsinzusatz seine Aktivität verlieren sollte (5).
Eine Negativkontrolle, die eine unspezifische Zerstörung der Bakteriozine ausschließen sollte, lieferte der Providencia rettgeri-Stamm J5, dessen Bakteriozin, ein Phagenschwanz, durch Trypsin nicht angegriffen wird (6).

4. Ausschluß von Bakteriophagen

Drei verschiedene Indikatorstämme wurden in 1 ml BHIGT-Bouillon bis zu einer OD von ca. 6000 eingerieben (ungefähr 6×10^9 KB/ml). Jeder Indikator wurde in zwei Röhrchen zu 0,5 ml aufgeteilt. Jeweils einem Röhrchen eines Indikators wurden 250 µl, dem anderen 25 µl des 100-fach angereicherten Lysats zupipettiert. Schließlich wurden 4 ml Softagar

zugegeben, mit der Suspension gemischt und auf eine BHIGT-Agarplatte ausgegossen. Die Medien wurden 24 h lang bei 37°C im Anaeobiertopf bebrütet.

5. Sedimentationsverhalten (Saccharosegradient)

Hemmstoffe sinken innerhalb des Gradienten durch die Zentrifugation ab und können je nach Sedimentationsgeschwindigkeit in bestimmten Fraktionen des Gradienten nachgewiesen werden.

Lineare Saccharosegradienten von 5% bis 20% wurden mit Hilfe von zwei verbundenen Rohren hergestellt. In ein Rohr wurden 2,2 ml einer 5-prozentigen Saccharoselösung eingefüllt, in das andere 2,2 ml einer 20-prozentigen. Die Saccharose wurde in 0,06 M Phosphatpuffer pH 6,8 gelöst. Mit einer rotierenden Plexiglasschraube, die in das Rohr mit der 20-prozentigen Lösung eintauchte, wurden die beiden Lösungen miteinander vermischt. Der so entstehende Gradient wurde über einen Schlauch am unteren Ende des Rohres mit der 20-prozentigen Lösung in ein Zentrifugenröhrchen geführt und vorsichtig mit 500 µl eines 100-fach angereicherten Lysats überschichtet. Dieser Gradient wurde nun 60 min lang bei 30000 min^{-1} und 20°C in einem Schwenkrotor von Beckman (SW 50.1) zentrifugiert.

Anschließend wurden die Zentrifugenrohre in ein Stativ

eingespannt, luftdicht abgeschlossen und mit einer ölgefüllten Spritze verbunden, sodaß ein hydraulisches System entstand. Der Stempel der Spritze konnte durch Drehen an einer Schraube feindosiert bewegt werden. Die Röhre wurden an ihrem tiefsten Punkt mit einer Kanüle angestochen, und der Inhalt durch Hineindrehen des Stempels in die Spritze in Fraktionen von 12 Tropfen (ca. 250 µl) aufgeteilt. Dabei konnten aus einem Röhrchen etwa 20 Fraktionen gewonnen werden.

Der Hemmstoffnachweis in den einzelnen Fraktionen erfolgte wie unter III.2.a beschrieben. In einer fortlaufenden Kette wurden aus jeder Fraktion 5 µl auf den Indikatorsoftagar getropft, um einen direkten Vergleich zwischen den einzelnen Fraktionen zu haben. Auf diese Weise war die Fraktion mit der höchsten Hemmstoffkonzentration sicher zu erkennen.

V. Der Einfluß von Trypsin auf die Wirkung der Hemmstoffe

Es wurden drei Möglichkeiten ins Auge gefaßt: Hat Trypsin einen Einfluß auf die Synthese während der Wachstumsphase des Producerstammes in der Flüssigkultur, aktiviert es den Hemmstoff im Lysat, oder bewirkt es am Indikator etwas, was ihn seines "Schutzes" beraubt?
Je drei Lysate von zwei Producern wurden unter unterschiedlichen Bedingungen aufbereitet bzw. verarbeitet.
Bei allen Variationen in der Präparation wurden die Lysate 20-fach angereichert. Als Kontrolle diente jeweils ein Lysat ohne Trypsin.

- Zugabe von Trypsin zur Flüssigkultur des Producerstammes.

Bei der Herstellung der Lysate wurde folgendermaßen vorgegangen:
Medium, Einsaat und Mitomycin C-Zugabe wurden wie gehabt beibehalten. Der einzige Unterschied zu der in III.2.a beschriebenen Methode lag darin, daß die Bebrütung der Flüssigkultur nach 24 h unterbrochen wurde, und Trypsin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben wurde. Um auszuschließen, daß ein evtl. abweichendes Ergebnis auf den schädigenden Einfluß von Sauerstoff (was beim Öffnen der Anaerobiertöpfe unvermeidlich ist) zurückzuführen ist, wurde

als Kontrolle je eine Flüssigkultur der beiden Producer ohne Trypsin im selben Anaerobiertopf mitgeführt. Jeweils zur Hälfte der Präparationen wurde nach der 20-fachen Anreicherung noch einmal 100 µg/ml Trypsin hinzugefügt und alle Varianten auf den Indikatorsoftagar aufgetropft.

- Zugabe von Trypsin zum Lysat im Anschluß an die Präparation.

Nach der 20-fachen Anreicherung wurde Trypsin in einer Konzentration von 100 µg/ml einem Teil des Lysats zugegeben. Je 8 - 10 µl des Lysats ohne und parallel dazu mit Trypsin wurden anschließend auf den Indikatorsoftagar aufgetropft.

- Zugabe von Trypsin zum Indikatorstamm im Softagar.

In dieser Variante wurde Trypsin in einer Konzentration von 100 µg/ml dem Indikatorsoftagar unmittelbar vor dem Ausgießen auf BHIGT-Agarmedien zugesetzt. Das 20-fach angereicherte Lysat wurde einmal ohne und einmal mit Trypsin auf den Indikatorsoftagar aufgetropft.

Als Kontrolle wurden auf alle Indikatorrasen 8 - 10 µl einer Trypsinlösung mit 100 µg/ml und 200 µg/ml aufgetropft. Die Medien wurden anschließend 24 h bei 37°C anaerob bebrütet.

D. ERGEBNISSE

I. Mitomycin C-MHK und Wahl der Mitomycinkonzentration zur Induktion der Hemmstoffsynthese

Die Agarmedien mit 10^4 KB pro Punkt wurden nicht zur Auswertung herangezogen, da auf der Kontrollplatte ohne Mitomycin C bei dieser Einsaat kein homogenes Wachstum vorhanden war. Erst bei dem Inoculum von 10^6 KB pro Punkt war der Impfpunkt auf der Kontrollplatte homogen bewachsen, d. h. es waren keine Einzelkolonien mehr sichtbar.
Als Endpunkt galt diejenige Konzentration, bei der der Stamm weniger als 50% des Wachstums im Vergleich zum Wachstum auf der Kontrollplatte ohne Mitomycin C erreichte.

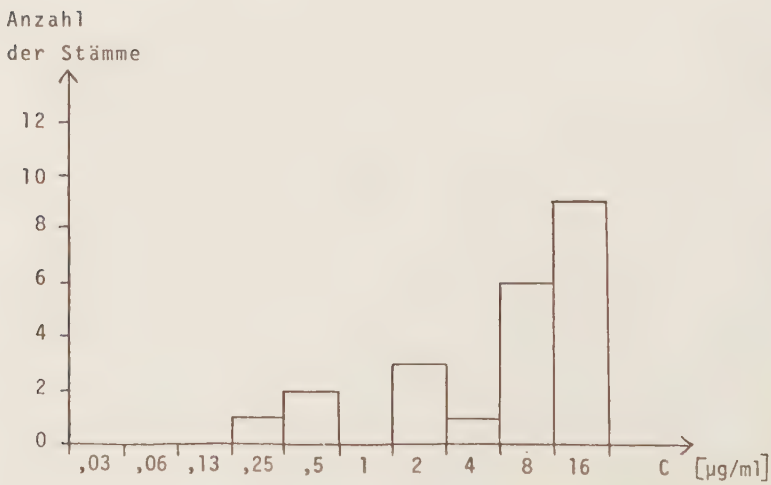
● 75% - 100% Wachstum = +
◐ 50% - 74% " = +/-
◒ 25% - 49% " = -/+
○ 0% - 24% " = -

Tabelle 1: Mitomycin-MHK von 22 Cl. difficile-Stämmen

Stamm	.06	.13	.25	.5	1	2	4	8	16	C [µg/ml]
22						+	-			
39								+	-	
49							+	+/-	-	
67						+	+/-	-		
68								+	-	
73								+	-	
83							+	+/-	-	
88						+	+/-	-		
91								+	-	
92								+	-	
94			+	-						
103							+	+/-	-	
139						+	+/-	-		
187						+	+/-	-		
232							+	+/-	-	
234				+	+/-	-				
246	+	+/-	-/+	-						
253					+	-/+	-			
298			+	-/+	-					
299						+	+/-	-/+	-	
305				+	+/-	-				
347						+	+/-	-		

Da bei Cl. difficile in Bezug auf die Mitomycin C-Empfindlichkeit keinerlei Anhaltspunkte vorhanden waren, sollte mit der MHK-Bestimmung getestet werden, bis zu welcher Konzentration Mitomycin C zugesetzt werden kann, ohne einen Stamm am Wachstum zu hindern.
Die MHK-Bestimmung wurde nur für 22 Stämme durchgeführt. Alle später erhaltenen und verwendeten Stämme zeigten ohne Ausnahme bei der gewählten Mitomycin C-Konzentration keine Wachstumshemmung. Einer Induktion der Hemmstoffsynthese mit einer Mitomycin C-Konzentration von 0,06 µg/ml in festem Nährmedium bzw. 0,13 µg/ml in flüssigem Nährmedium stand also nichts mehr im Wege, da die MHK aller Stämme darüber lag.

Abbildung 1: Mitomycin C-MHK bei Cl. difficile (n = 22)



II. Hemmstoff-produzierende und hemmstoff-sensible Stämme bei Cl. difficile

1. Hemmstoffsynthese auf festem Medium

22 Stämme von Cl. difficile (C. E. Nord 22 - 347) wurden getestet. Alle Stämme wurden sowohl auf Producer- als auch auf Indikatoreigenschaft untersucht. Aus 484 geprüften Kombinationsmöglichkeiten ergab sich:
232 war der einzige Producer, der gefunden werden konnte. Er hemmte die Indikatoren 83, 246, 253 und 305. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar. Alle Hemmhöfe konnten mit + bewertet werden.

2. Hemmstoffsynthese in flüssigem Medium

a) In flüssigem Medium synthetisierte Hemmstoffe (nicht angereichert).

Das erhaltene Ergebnis war identisch mit dem auf festem Medium. Unter den 22 Stämmen konnten keine neuen Producer oder Indikatoren gefunden werden. Die Hemmhöfe waren in ihrer Qualität wechselnd und nicht so deutlich ablesbar wie auf festem Medium. Die Ergebnisse schwankten bei Wiederholungen von -/+ bis +/-. Klare Hemmhöfe konnten mit dieser Methode nicht gefunden werden.

b) In flüssigem Medium synthetisierte, 20-fach angereicherte Hemmstoffe.

Nach 20-facher Anreicherung waren die Hemmhöfe wesentlich deutlicher, sie konnten meist mit + bewertet werden.
Die Anreicherung erbrachte unter den 22 Stämmen drei neue Producer mit neuen Indikatoren. Neben diesen Stämmen von C. E. Nord wurden mit dieser Methode zusätzlich 12 Stämme von U. Ullmann untersucht. Innerhalb dieser Gruppe wurden 5 Producer gefunden.
Werden alle Stämme beider Gruppen gegeneinander getestet (1156 Möglichkeiten) so ergibt sich:

Tabelle 2: Hemmstoff-produzierende und hemmstoff-sensible Stämme bei Cl. difficile (n = 34)

Producer		Indikatoren	
Nord:	103	Nord:232	Ullmann:5c,53,637
	232	83,103,246,253,305	53,637
	298	91,299	137,139
	305	299	5c
Ullmann:	41	234,299	-
	136	73	53,637
	137	103	-
	139	299	5c
	637	73,246,253,299	139

c) Der Einfluß von Trypsin auf die Wirkung der Hemmstoffe.

Die Zahl der Producer und Indikatoren stieg sprunghaft an, als damit begonnen wurde, die Lysate eines jeden Producers zusätzlich zum üblichen Verfahren mit Trypsinzusatz auf den Indikatorsoftagar aufzutropfen. Dabei konnten die Producer in sieben verschiedene Typen eingeteilt werden:

Typ A: hemmt Indikatoren nur mit Trypsin

Typ B: hemmt dieselben Indikatoren mit und ohne Trypsin

Typ C: hemmt Indikatoren nur ohne Trypsin

Typ D: hat zwei Komponenten (Typ A und B)

Typ E: hat drei Komponenten (Typ A, B und C)

Typ F: hat zwei Komponenten (Typ B und C)

Typ G: hat zwei Komponenten (Typ A und C)

Die Typen D, E, F und G können entsprechend der oben angeführten Aufschlüsselung als Kombinationen von A, B und C gesehen werden.

Die prozentuale Verteilung der einzelnen Typen innerhalb der Gesamtzahl der Producer ergibt folgendes Bild:

Tabelle 3: Verteilung der "Trypsin"-Typen unter den Producern (n = 46)

	absolute Häufigkeit	prozentuale Häufigkeit
Typ A	29	63%
Typ B	6	13%
Typ C	1	2%
Typ D	2	4%
Typ E	3	7%
Typ F	2	4%
Typ G	3	7%

Die 22 Stämme von C. E. Nord sowie die 12 Stämme von U. Ullmann (außer Stamm 41) wurden nicht mit dieser Methodik untersucht, d. h. ihren angereicherten Lysaten wurde beim Auftropfen auf den Indikatorsoftagar kein Trypsin zugesetzt. Die Producer, die in diesen beiden Gruppen gefunden wurden, werden im Folgenden mit Typ O bezeichnet.

Erläuterungen zu Tabelle 4:

In dieser Tabelle sind nur die hemmstoff-produzierenden Stämme und ihr entsprechender Typ aufgeführt.

Mitomycin C-Induktion 0,13 µg/ml.

+/- = schwache Hemmung

\+ = deutliche Hemmung

⊕ = sehr deutliche Hemmung

Hierbei ist zu beachten, daß immer zwei Zeichen übereinander stehen. Das obere Zeichen steht für das Ergebnis ohne Trypsin, das untere für das Ergebnis mit Trypsin.

Insgesamt wurden 144 Stämme auf ihre Producereigenschaft und 134 Stämme auf ihre Indikatoreigenschaft untersucht. Die in den Tabellen 2 und 4 aus Platzgründen nicht aufgeführten Stämme, bei denen kein Hemmstoff nachgewiesen werden konnte, sind unter Materialien (Stämme) aufgelistet.

Auf Producereigenschaft nicht untersucht wurde der Stamm 604, auf Indikatoreigenschaft nicht untersucht wurden die Stämme 616, 794, 850, 903, 906 und 1121.

Tabelle 4: Hemmstoff-produzierende Stämme bei Cl. difficile (n = 144)

Producer	Typ	Indikatoren														
		628	629	640	643	655	657	669	675	676	677	678	679	680	682	690
583	A			+̄												
599	B															
669	A					⊕̄										
676	A					+̄			+̄							
677	A					+̄				+/̄-						
678	A															
679	A									+/̄-					+̄	
690	A															
699	A															
700	A					⊕̄				⊕̄						
701	C					+/-			+/-		+/-					
702	E					+/̄-										
714	A						+/̄-				+̄	+̄	⊕̄	+̄		
721	A					⊕̄										
726	B					⊕ ⊕̄				⊕ ⊕̄						
752	B															
756	A					⊕̄		+/̄-			+/̄-					
757	F															
764	G															
770	A					⊕̄			+̄							
772	F															
778	A												+̄			
779	G															
784	B															
789	E						+̄		+/̄-		⊕̄	⊕̄	⊕̄	⊕̄		

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		699	700	701	702	706	714	721	722	726	749	750	752	756	757
583	A														
599	B														
669	A	∓							⊕̄		∓				
676	A						∓			⊕̄		⊕̄			
677	A	⊕̄							⊕̄		⊕̄				+/-
678	A								∓						
679	A	+/-													
690	A	∓							∓		⊕̄				+/-
699	A			+/-								∓			+/-
700	A	∓							⊕̄		⊕̄				+/-
701	C														+/-
702	E	∓							⊕̄						‡/-
714	A		+/-			+/-									
721	A	⊕̄				∓					∓				
726	B	‡									⊕̄				
752	B							‡/-							
756	A										⊕̄				
757	F														
764	G											+/-			+/-
770	A						+/-			⊕̄		⊕̄			
772	F							‡/-							
778	A					∓									
779	G												+/-		+/-
784	B														
789	E		+/-			⊕̄						⊕̄	+/-		+/- ⊕̄

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		764	770	772	778	779	782	783	784	785	786	787	788	789	790
583	A														
599	B														
669	A	$\bar{+}$				$\bar{+}$									
676	A				$+\bar{/}-$					$\bar{\oplus}$	$\bar{\oplus}$			$\bar{+}$	$\bar{\oplus}$
677	A	$\bar{\oplus}$	$+\bar{/}-$			$\bar{\oplus}$									
678	A														
679	A	$+\bar{/}-$	$\bar{\oplus}$			$+\bar{/}-$									
690	A	$\bar{+}$				$\bar{+}$									
699	A				$+\bar{/}-$									$\bar{\oplus}$	$\bar{\oplus}$
700	A	$\bar{\oplus}$	$\bar{\oplus}$												
701	C						$+\underline{/}-$	$+\underline{/}-$							
702	E	$+\bar{/}-$						$+\underline{/}-$			$+\underline{/}-$		$\ddot{+}\bar{/}-$	$+\bar{/}-$	
714	A				$\bar{+}$	$+\bar{/}-$									$+\bar{/}-$
721	A	$\bar{+}$	$\bar{+}$			$\bar{\oplus}$									
726	B	$\bar{\oplus}$	$\bar{\oplus}$			$\bar{\oplus}$							$\ddot{+}$	$\ddot{+}\bar{/}-$	
752	B										$\ddot{+}\bar{/}-$		$\ddot{+}\bar{/}-$		
756	A	$\bar{+}$				$\bar{+}$	$\bar{+}$								
757	F						$+\underline{/}-$						$\ddot{+}\bar{/}-$		
764	G						$+\underline{/}-$								
770	A				$+\bar{/}-$					$\bar{\oplus}$	$\bar{\oplus}$		$\bar{\oplus}$	$\bar{\oplus}$	
772	F						$+\underline{/}-$	$+\underline{/}-$			$+\underline{/}-$		$\ddot{+}\bar{/}-$		
778	A														
779	G					$+\underline{/}-$									
784	B														
789	E										$\bar{\oplus}$				

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		791	792	793	795	797	798	799	801	804	805	806	808	809	813
583	A														
599	B														
669	A														
676	A														
677	A														
678	A														
679	A														
690	A														
699	A														
700	A														
701	C														
702	E														
714	A														
721	A														
726	B														
752	B														
756	A														
757	F														
764	G														
770	A														
772	F														
778	A														
779	G														
784	B														
789	E														

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		815	816	826	836	849	855	856	864	869	871	876	888	902	904
583	A														
599	B										⊕				
669	A														
676	A														
677	A														
678	A														
679	A														
690	A														
699	A														
700	A														
701	C														
702	E														
714	A														
721	A														
726	B														
752	B														
756	A														
757	F														
764	G														
770	A														
772	F														
778	A														
779	G														
784	B														
789	E														

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		909	915	1047	1049	1100	1104	1122	1123	15763	16170	16249	16476	F 7	U 637
583	A											+'			
599	B														
669	A														
676	A														+'
677	A														
678	A														
679	A														
690	A														
699	A														
700	A														
701	C														
702	E														
714	A														
721	A														
726	B														
752	B														
756	A														
757	F														
764	G														
770	A														+'
772	F														
778	A														
779	G														
784	B														
789	E														

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren														
		581	882	583	584	585	598	599	602	603	604	605	606	611	612	617
790	A															
791	A															
795	A						+-									
797	A															
805	A								⊕-							
808	A															
813	A	⊕-														
815	A								+-							
826	A															
850	D															
856	A					⊕-										
903	A															
906	A					⊕-							+-			
1100	A					⊕-										
1123	A					⊕-										
F 6	E								+/-⊕							
F 7	A								⊕-		+-					
F 9	D										+-					
F10	B															
F11	B															
U41	G															

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren														
		628	629	640	643	655	657	669	675	676	677	678	679	680	682	690
790	A												+/-			
791	A															+
795	A															
797	A															
805	A															
808	A															
813	A															
815	A															
826	A															
850	D					+/- +				⊕ ⊕						
856	A															
903	A			⊕												
906	A															
1100	A															
1123	A															
F 6	E															
F 7	A															
F 9	D															
F10	B															
F11	B															
U41	G															

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		699	700	701	702	706	714	721	722	726	749	750	752	756	757
790	A														
791	A														
795	A														
797	A														
805	A														
808	A			+											⊕
813	A														
815	A														
826	A			⊕			⊕		⊕	⊕		+			⊕
850	D	⊕							+/⊕		+				
856	A														
903	A														
906	A														
1100	A														
1123	A														
F 6	E														
F 7	A														
F 9	D														
F10	B														
F11	B														
U41	G														

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		764	770	772	778	779	782	783	784	785	786	787	788	789	790
790	A														
791	A														
795	A														
797	A														
805	A								$\overset{-}{\oplus}$						
808	A						$\overset{-}{\oplus}$								
813	A														
815	A								$\overset{-}{\oplus}$						
826	A						$\overset{-}{\oplus}$				$\overset{-}{+}$			$\overset{-}{+}$	$\overset{-}{\oplus}$
850	D	$\overset{+}{\oplus}$	$\overset{-}{+}$			$\oplus$ $\oplus$									
856	A														
903	A														
906	A								$\overset{-}{\oplus}$						
1100	A														
1123	A														
F 6	E								$\overset{-}{\oplus}$						
F 7	A								$\overset{-}{\oplus}$						
F 9	D														
F10	B														
F11	B														
U41	G														

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		791	792	793	795	797	798	799	801	804	805	806	808	809	813
790	A														
791	A														
795	A		⊕								+				
797	A		⊕												
805	A														
808	A														
813	A										⊕				
815	A														
826	A														
850	D														
856	A														
903	A					⊕									
906	A					⊕					⊕				⊕
1100	A														
1123	A										⊕				
F 6	E						⊕								
F 7	A														
F 9	D														
F10	B														
F11	B														
U41	G														

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		815	816	826	836	849	855	856	864	869	871	876	888	902	904
790	A														
791	A														
795	A		⊕												
797	A									∓	⊕	⊕			
805	A														
808	A														
813	A			∓			⊕						⊕		
815	A														
826	A														
850	D														
856	A		∓			∓									
903	A														
906	A		⊕	∓											
1100	A		⊕												
1123	A			⊕				⊕					⊕	⊕	
F 6	E												⊕		
F 7	A												⊕		
F 9	D			⊕											
F10	B			⊕											
F11	B														
U41	G				±										

Tabelle 4: Fortsetzung

Producer	Typ	Indikatoren													
		909	915	1047	1049	1100	1104	1122	1123	15763	16170	16249	16476	F 7	U 637
790	A	⊕̄	⊕̄												
791	A						⊕̄								
795	A														
797	A														
805	A														
808	A														
813	A	+̄									⊕̄	⊕̄			
815	A														
826	A														
850	D	+̄					+̄								
856	A										+̄				
903	A		⊕̄		⊕̄			⊕̄			⊕̄	⊕̄			
906	A	⊕̄				⊕̄						⊕̄			
1100	A														
1123	A											⊕̄	+̄		
F 6	E					±				⊕̄					
F 7	A									+/-					
F 9	D	⊕ ⊕													
F10	B	⊕ ⊕												⊕ ⊕	
F11	B													⊕ ⊕	
U41	G	⊕̄													

Aus den Tabellen 2 und 4 läßt sich zusammenfassen:

1. Als Producer getestet: 144 Stämme = 100%
   positiv: 54 Stämme = 38%
   negativ: 90 Stämme = 62%
2. Als Stämme mit identischem Hemmuster erwiesen sich die Producer 305 und U11 139
   669 und 677
   805 und 815
   Obwohl in der Producereigenschaft identisch, reagierte keines der drei Paare in seiner Indikatoreigenschaft identisch.
3. Als Indikator getestet: 134 Stämme = 100%
   positiv: 102 Stämme = 76%
   negativ: 32 Stämme = 24%
4. Stämme, die sowohl als Producer als auch als Indikator positiv waren (33 Stämme = 23%):
   103, 232, 305; U11 139, 637;
   669, 676, 677, 678, 679, 690, 699, 700, 701, 714, 721, 726, 752, 757, 764, 770, 778, 779, 784, 789, 790, 797, 805, 813, 826, 856, 1100; F7.

Möglichkeiten einer Typisierung

Für eine Typisierung können zweierlei Aspekte ins Auge gefaßt werden:

1. Erfolgt die Typisierung aufgrund der Hemmstoffsensibilität, d. h. aufgrund der Indikatoreigenschaft, so liegt die Typisierbarkeit bei 76%. Diese 76% entsprechen dem Anteil der Stämme, die, auf ihre Indikatoreigenschaft getestet, von einem oder mehreren Hemmstoffen gehemmt wurden.
2. Erfolgt die Typisierung aufgrund der Indikator- und der Producereigenschaft, so erhöht sich der Prozentsatz der typisierbaren Stämme auf 85%.

   Von den 102 Indikatorstämmen sind 33 auch als Producer positiv. Diese 33 müssen von der Gesamtzahl abgezogen werden. Demnach erhält man:

   102 Indikatoren + 54 Producer - 33 = 123 typisierbare Stämme

   Insgesamt wurden 144 Stämme untersucht.

III. Charakterisierung der Hemmstoffe von Cl. difficile

1. Wirtsspezifität der Hemmstoffe von Cl. difficile

Der Hemmstoff des Producers 232 erwies sich als sehr streng spezifisch in seinem Wirtsspektrum. Von den 13 als Indikatoren getesteten Stämmen (B. vulgatus, B. fragilis, B. thetaiotaomicron und B. distasonis, Peptokokken, Cl. sordellii und Cl. sporogenes) wurde kein einziger Stamm durch das 100-fach angereicherte Lysat in seinem Wachstum gehemmt.

2. Sensibilität gegenüber Wärmeeinwirkung

100-fach angereichertes Lysat des Producers 232 wurde 30 min lang im Wasserbad unterschiedlichen konstanten Temperaturen ausgesetzt. Als Indikatoren wurden die Stämme 83 und 246 verwendet.

Tabelle 5: Wärmeempfindlichkeit des Hemmstoffs 232

Indikator	Temperatur [°C] 45	50	55	60	65	70	80	90	100	unbeh. Lysat
83	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
246	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ = Hemmung des Indikatorstammes
- = keine Hemmung des Indikatorstammes

Der Hemmstoff des Producers 232 verliert also bei Temperaturen über 45°C seine antibakterielle Aktivität.

3. Sensibilität gegenüber Trypsin

a) Bei Hemmstoffen aus flüssigem Medium.

100-fach angereichertes Lysat des Producers 232 wurde mit Trypsin in Konzentrationen von 50, 100 und 200 µg/ml versetzt und auf die Indikatoren 83, 246 und 253 aufgetropft. Als Kontrolle diente unbehandeltes Lysat.
Die antibiotische Wirksamkeit des Hemmstoffs blieb bei jeder Konzentration und gegenüber jedem Indikatorstamm voll erhalten.

Tabelle 6: Trypsinempfindlichkeit des Hemmstoffs 232 in flüssigem Medium

Trypsin [µg/ml] \ Indikatoren	83	246	253
0	+	+	+
50	+	+	+
100	+	+	+
200	+	+	+

b) Bei Hemmstoffen auf festem Medium.

Als Teststamm diente der Producer 232 mit den Indikatoren 83 und 246. Der Versuch war nach der Multipoint-Inoculator-Methode (III.1.a) aufgebaut und beinhaltete als Variante den Trypsinzusatz von 50 µg/ml im Agar.
Der Hemmstoff des Producers 232 wurde durch das Trypsin im Nährboden nicht angegriffen und erwies sich damit als trypsin-stabil.

Tabelle 7: Trypsinempfindlichkeit des Hemmstoffs 232 auf festem Medium

Indikator	83	246
BHIGT	+	+
BHIGT + Mito (0,06)	+	+
BHIGT + Mito + Trypsin	+	+
BHIGT + Trypsin	+	+

Als Kontrollen wurden der Klebsiella pneumoniae-Stammm K1, der ein trypsin-labiles Bakteriozin produziert, und der Providencia rettgeri-Stamm J5, der ein trypsin-stabiles Bakteriozin produziert, mitgeführt.

Tabelle 8: Trypsinempfindlichkeit des Bakteriozins K1

Indikator	K61
BHIGT	-
BHIGT + Mito (0,25)	+
BHIGT + Mito + Trypsin	-
BHIGT + Trypsin	-

Tabelle 9: Trypsinempfindlichkeit des Bakteriozins J5

Indikator	J38
BHIGT	-
BHIGT + Mito (0,25)	+
BHIGT + Mito + Trypsin	+
BHIGT + Trypsin	-

Erläuterungen zu den Tabellen 7 - 9:

Die Wertung + oder - bezieht sich auf den Indikatorstamm im Softagar.

+: Der Stamm wurde im Wachstum gehemmt.

-: Der Stamm wurde nicht im Wachstum gehemmt.

4. Ausschluß von Bakteriophagen

In keinem Rasen der Indikatorstämme 83, 246 und 253, die mit unterschiedlichen Lysatmengen des Hemmstoffs 232 behandelt wurden, konnten charakteristische Phagenplaques festgestellt werden. Alle Rasen waren homogen gewachsen.

5. Sedimentationsverhalten

Es wurden insgesamt drei Saccharosegradienten erstellt, die alle unter denselben Bedingungen mit Lysat überschichtet,

zentrifugiert und anschließend fraktioniert wurden. Als Producer wurde der Stamm 232, als Indikatoren die Stämme 83, 246 und 253 verwendet.

Tabelle 10 zeigt bei fortlaufendem Auftropfen der 21 bzw. 22 Fraktionen einen deutlichen Peak der antibiotisch wirksamen Substanz in den Fraktionen 11 - 13.

Tabelle 10: Saccharosegradient des Hemmstoffs 232

	Fraktion																					
Indikator	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
83	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+	⊕	⊕	+	+-	-	-	-	-	-	-	-	-
246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	⊕	⊕	+	-	-	-	-	-	-	-	-	/
253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+	⊕	+	-	-	-	-	-	-	-	-	/

+- = schwache Hemmung

\+ = deutliche Hemmung

⊕ = sehr deutliche Hemmung

Verglichen mit einer Eichkurve entspricht die Dichte des Hemmstoffs derjenigen einer 12- bis 13-prozentigen Saccharoselösung.

IV. Die Rolle von Trypsin bei der Wirkung der Hemmstoffe

Beim Screening der 144 Stämme auf Producer- und Indikatoreigenschaft stellte sich heraus, daß der größte Teil der Producer erst durch den Zusatz von Trypsin zum Lysat entdeckt wurde (s. Tab. 3). Um diesem Phänomen auf die Spur zu kommen, wurde Trypsin in verschiedenen Phasen des Experiments zugegeben: einmal zur Flüssigkultur während der Wachstumsphase, dann zum Lysat im Anschluß an die Präparation, und schließlich zum Indikatorstamm im Softagar.

Als Producer wurden die Stämme 797 und 906 (beide vom Typ A, d. h. die Lysate hemmen nur nach Trypsinzugabe) verwendet. Die Lysate wurden 20-fach angereichert.
Als Indikatoren dienten

für 797: 784, 792, 876, 1104

für 906: 784, 797, 909

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11 und 12 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Die Wirkung von Trypsin bei Producer 797

Indikator	784	792	876	1104
a	-	-	-	-
b	-	-	-	-
c	-	-	-	-
d	+	+	+	+
e	-	-	-	-
f	+	+	+	+

Tabelle 12: Die Wirkung von Trypsin bei Producer 906

Indikator	784	797	909
a	-	-	-
b	-	-	-
c	-	-	-
d	+	+	+
e	-	-	-
f	+	+	+

a = ohne Trypsin
b = Trypsin zur Flüssigkultur
c = Trypsin zur Flüssigkultur und nach der Präparation
d = Trypsin nach der Präparation
e = Trypsin zum Softagar
f = Trypsin zum Softagar und nach der Präparation

Die Kontrollen mit 100 µg/ml und 200 µg/ml Trypsin verursachten auf dem Indikatorrasen keine Hemmung.

Wie die drei Versuche zeigen, hat Trypsin weder einen positiven Einfluß auf die Synthese des Hemmstoffs, noch verändert es die Sensibilität des Indikators gegenüber dem Hemmstoff. In diesem Fall muß davon ausgegangen werden, daß das Trypsin den Hemmstoff aus einer inaktiven in eine aktive Form überführt, und erst damit die antibiotische Wirkung des Hemmstoffs gegeben ist.

E. DISKUSSION

1. Methodik

Für die Bestimmung der Mitomycin C-MHK waren 10^4 Koloniebildner pro Impfpunkt zu wenig um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Hingegen war bei einer Einsaat von 10^6 Koloniebildnern pro Impfpunkt homogenes Wachstum zu beobachten und eindeutige Ablesbarkeit möglich.
Bei der Durchführung der Typisierung traten ab und zu Ableseschwierigkeiten auf. Sie konnten durch Abtrocknen der mit Indikatorrasen beimpften Medien über Nacht behoben werden.
Die Überprüfung der aus flüssigem Medium gewonnenen Hemmstoffe auf Trypsinstabilität ergab wesentlich deutlichere Hemmhöfe bei den mit Trypsin behandelten Lysaten im Vergleich zu den Hemmhöfen der unbehandelten. Daraufhin wurden alle Lysate sowohl unbehandelt als auch nach Trypsineinwirkung auf die Indikatorsoftagarrasen getropft.

2. Ergebnisse

Der Anteil hemmstoff-produzierender Stämme ließe sich durch Erhöhung der Mitomycin C -Konzentration für die Induktion eventuell noch steigern. Dazu müßte allerdings für jeden einzelnen Stamm die MHK ermittelt werden.

Die Hemmstoffsynthese in flüssigem Medium erbrachte unangereichert keinen Vorteil im Vergleich zu der auf festem Medium. Erst 20-fache Anreicherung zusammen mit der Trypsinbehandlung ließ den Anteil der Producer ansteigen. Als Folge der Trypsinbehandlung waren die Hemmhöfe wesentlich deutlicher, und bisher hemmstoff-negative Stämme verursachten nun deutliche Hemmhöfe.

Die hemmstoff-positiven Lysate lassen sich in 3 verschiedene Typen bzw. eine Kombination daraus einteilen: Hemmstoff vom Typ A wird durch Trypsin aus einer inaktiven in eine aktive Form überführt. Typ B ist trypsin-neutral, d. h. wird weder aktiviert noch inaktiviert. Typ C wird von Trypsin vollständig inaktiviert. Die übrigen Hemmstofftypen D bis G stellen eine Kombination aus zwei dieser Typen oder von allen dreien dar. Einige Stämme von Cl. difficile produzieren drei verschiedene Hemmstofftypen (trypsinsensitiv, trypsinstabil, proteingebunden) mit jeweils unterschiedlichem Spektrum.

Der Angriffspunkt des Trypsins liegt weder in der Hemmtoff-

synthese noch am Indikator. Trypsin überführt lediglich den Hemmstoff aus einer inaktiven in eine aktive Form (siehe D. IV.). Als Mechanismus wäre eine Freilegung eines Aktivitätszentrums am Hemmstoff etwa durch Ablösen eines Mantelproteins denkbar.

Der Hemmstoff des Stammes 232 erwies sich als spezies-spezifisch, sedimentierbar, hitzelabil, trypsin- und chloroformstabil. Phagen konnten als Ursache der Hemmwirkung ausgeschlossen werden.
Diese Eigenschaften und die im Saccharosegradienten ermittelte Dichte deuten darauf hin, daß es sich bei diesem Hemmstoff um ein großes Bakteriozin handelt (9). Zur Aufklärung der Struktur müßten noch weitergehende Untersuchungen wie z. B. Elektronenmikroskopie durchgeführt werden.

Die Typisierung des Stammkollektivs ergab, daß aufgrund ihrer Indikatoreigenschaft 76%, aufgrund ihrer Producereigenschaft 38% und in Kombination von beiden 85% aller Stämme typisiert werden konnten. 23% der Stämme wiesen sowohl Indikator- als auch Producereigenschaft auf.
Der Prozentsatz typisierbarer Stämme ließe sich möglicherweise weiter erhöhen, wenn die bis jetzt nicht typisierbaren Stämme als Indikatoren und noch nicht getestete Stämme

gezielt auf ihre Producereigenschaft hin untersucht würden. Dafür sollten Isolate aus unterschiedlichen geographischen Regionen verwendet werden, da eine Typenvielfalt an einem Ort weniger wahrscheinlich ist. Unter den 6 Stämmen aus Frankfurt waren 5 Producer, aber nur 1 Indikator. Die Stämme aus Stockholm zeigten in Kombination mit den Stämmen aus Frankfurt in hohem Anteil Indikatoreigenschaften.

3. Vergleich mit anderen Typisierungssystemen

Die hier ausgearbeitete Typisierungsmethode ist relativ zeit- und arbeitsaufwendig, da der zu typisierende Stamm sowohl als Producer als auch als Indikator getestet werden muß, wofür drei Tage erforderlich sind. Vorteilhaft sind die große Typenvielfalt, die Spezifität und der Typisierungsgrad von 85%. Das sind gute Voraussetzungen, um mit diesem Typisierungssystem epidemiologische Untersuchungen anzustellen.

Die bis jetzt bekannten Typisierungssysteme beruhen auf drei unterschiedlichen Prinzipien:

- Die Typisierung von Tabaqchali et al. (40) basiert auf dem unterschiedlichen Einbau von S^{35}-Methionin in bakterielles Protein und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung. Dieses Verfahren benötigt ungefähr die selbe Zeit wie die hier vorgestellte Methode. Es konnten damit 98% von 250 Stämmen typisiert und in 9 verschiedene Typen eingeteilt werden. Die größte Typenklasse umfaßte jedoch 70% der untersuchten Stämme. Isolate von PMC-Patienten kamen hauptsächlich in zwei der 9 Typen vor, Isolate von nicht erkrankten Müttern und Säuglingen einer Entbindungsstation traten dagegen in vier anderen Typen auf. Die Autorin zog daraus den Schluß, daß bei PMC-erkrankten Patienten bestimmte Typen häufiger auftreten.

- Sell et al. (38) entwickelte ein Typisierungssystem, das auf Bakteriophagen und Bakteriozinen von Cl. difficile beruht. Die Bakteriozine werden dort folgendermaßen charakterisiert: Sie sind hitzelabil, verlieren ihre Aktivität durch Verdünnen sowie nach 2wöchiger Lagerung im bei 4 °C, und ihre Hemmwirkung geht nach Passage auf einen sensitiven Indikatorrasen verloren. Durch Integration der Bakteriozine in sein bestehendes Bakteriophagensystem konnte er sowohl den Anteil der typisierbaren Stämme auf 52% erhöhen als auch eine größere Typenvielfalt erzielen. Bei dieser Methode müssen Phagen und Bakteriozine präpariert und auf ihre lytische Aktivität am zu testenden Indikatorrasen untersucht werden. Trotzdem ist der Anteil typiserbarer Stämme bei diesem System niedriger als bei der hier aufgestellten Methode.
- Die Serotypie von Delmee et al. (13) ist mit Abstand das schnellste und einfachste Verfahren. Delmee gewann durch Immunisierung von Kaninchen 6 verschiedene Antisera, mit denen 99% aller gestesteten Stämme durch Agglutination typisiert werden konnten. Ebenso wie Tabaqchali konnte Delmee die typisierten Stämme in zwei Gruppen einteilen, nämlich toxinbildende und nicht toxinbildende. Der Nachteil dieser Methode ist die geringe Typenvielfalt, die nur einen groben Überblick über die getesteten Stämme und keine epidemiologisch bedeutsame Feinanalyse erlaubt.

Um den Arbeitsaufwand der reinen Bakteriozinotypie zu verringern und die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, wäre es vorstellbar, einen Stamm mit einem festen Satz von Producern nur auf seine Indikatoreigenschaft zu testen. Dazu müßten größere Lysatmengen der Producer präpariert und konserviert werden, um sie je nach Bedarf zur Verfügung zu haben. Unter diesen Voraussetzungen wäre eine Typisierung innerhalb von 24 Stunden durchführbar und damit den oben aufgeführten Verfahren in puncto Zeit- und Arbeitsaufwand ebenbürtig oder sogar überlegen.

Producer- und Indikatoreigenschaften eines Stammes bleiben konstant, wie sich bei den Versuchen zur Charakterisierung der Hemmstoffe zeigte.

4. Klinische Aspekte

Mit einem sensiblen Typisierungssystem, wie es die Bakteriozinotypie darstellt, ließen sich viele bis jetzt nicht ausreichend geklärte Fragen der Epidemiologie und Infektiosität beantworten. Dazu müßten beispielsweise in abgrenzbaren Bereichen gehäuft auftretende Cl. difficile-Isolate auf ihre Typengleichheit bzw. Typenunterschiedlichkeit untersucht werden.

Die Frage, ob die an einer Infektion mit Cl. difficile erkrankten Patienten auf Isolierstationen verlegt werden sollen, könnte anhand der Ergebnisse einer Typisierung zuverlässig beantwortet werden.

Gehäuftes Auftreten von Cl. difficile-Infektionen in einer Station und das Übergreifen auf benachbarte Stationen zusammen mit einer Dreifachresistenz (Clindamycin, Tetracyclin, Rifampicin) konnte beobachtet werden (11). Dies deutet auf Kreuzinfektionen zwischen den Patienten hin. Das Pflegepersonal konnte anhand von Stuhluntersuchungen als Überträger ausgeschlossen werden.

Kreuzinfektionen zwischen Tier und Mensch werden für nicht sehr wahrscheinlich gehalten, obwohl die Trägerrate bei kleinen sowie bei großen Haustieren bis zu 30% reicht (2,36).

Sell et al. (38) untersuchte mit seinem auf Bakteriophagen

und Bakteriozinen beruhenden Typisierungssystem Cl. difficile-Isolate von 16 Patienten am 1. und 14. Tag der Erkrankung. In 56% der Fälle ergab die Typisierung der Probenpaare ein identisches Hemmuster. 19% unterschieden sich nur in einer Phagen- oder Bakteriozinreaktion. Bei 12% gab es mindestens eine identische Reaktion, und weitere 12% wiesen größere Unterschiede im Typisierungsmuster auf.
Weitergehende Typisierungen könnten abklären, auf welche Weise Säuglinge Cl. difficile-Infektionen erwerben. Eine Untersuchung von Al-Jumaili (1) zeigte, daß Stuhlproben des Pflegepersonals sowie Vaginaltupfer von 35 Müttern kurz vor der Entbindung negativ waren, während bei 16 der Neugeborenen Cl. difficile im Stuhl gefunden wurde. Insgesamt konnte Cl. difficile in Stuhlproben bei 65 von 92 Säuglingen nachgewiesen werden sowie in 10 von 110 Tupferproben aus der Umwelt (Fieberthermometer, Stethoskope, Waschbecken usw.). Holst et al. (23) untersuchte Zervikalabstriche von 15 Müttern kulturell auf Cl. difficile. Keine der Proben war positiv, obwohl bei allen Säuglingen dieser Mütter Cl. difficile gefunden wurde. Diese Ergebnisse sprechen für eine Infektion der Säuglinge aus der Umwelt und gegen eine Übertragung von der Mutter auf das Kind. Um diese Vermutung zu bestätigen, müßte nachgewiesen werden, daß die Cl. difficile-Isolate von den Säuglingen und die Isolate von den Tupferproben aus der Umgebung dem selben Typ angehören.

Für eine Infektion aus der Umgebung der Patienten spricht die Tatsache, daß auf Stationen mit Cl. difficile-Trägern bei 9,3% der Tupferproben Cl. difficile isoliert werden konnte, im Gegensatz zu 2,6% auf Stationen ohne bekannte Träger (26).

Wichtig für Prophylaxe und Therapie der pseudomembranösen Colitis wäre es, Genaueres über die Ansteckungs- und Ausbreitungswege dieser Krankheit zu erfahren, wofür ein sensibles Typisierungssystem wie das hier vorgestellte gute Anhaltspunkte liefern könnte.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der Spezies Clostridium difficile treten Stämme auf, die, durch Mitomycin C induziert, Substanzen produzieren, die andere Stämme dieser Spezies am Wachstum hindern.
2. 144 Stämme wurden auf ihre Producereigenschaft, 134 Stämme auf ihre Indikatoreigenschaft untersucht.
3. Unter den 144 Stämmen fand sich ein Produceranteil von 38%. Als Indikatoren erwiesen sich 76%. Sowohl Producer- als auch Indikatoreigenschaft besaßen 23% der Stämme. Stämme, die gegenüber ihrem eigenen Hemmstoff empfindlich sind, wurden nicht gefunden.
4. Bakteriophagen konnten als Ursache der Wachstumshemmung ausgeschlossen werden.
5. Die Hemmstoffe konnten in 3 Grundtypen eingeteilt werden: Typ A wird von Trypsin aktiviert, Typ B wird von Trypsin nicht beeinflußt, und Typ C wird von Trypsin inaktiviert. Es gibt Stämme, die nur einen Typ , zwei in beliebiger Kombination oder aber alle drei Typen von Hemmstoffen produzieren.
6. Ein Hemmstoff vom Typ B wurde näher charakterisiert. Er war streng wirtsspezifisch, hitzelabil, chloroformstabil und in der Ultrazentrifuge sedimentierbar. Diese Eigenschaften deuten auf ein großes Bakteriozin hin.

7. Hemmstoffproduktion und Hemmstoffsensibilität erwiesen sich durchweg als stabile Marker.
8. Mit dieser Arbeit wurde ein Weg für die Aufklärung der Epidemiologie von Cl. difficile-Infektionen mit Hilfe der Bakteriozinotypie eröffnet.

TYPING OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE BY BACTERIOCINS

F. SUMMARY

1. In the species Clostridium difficile strains appear which, when induced by Mitomycin C, produce substances which hinder the growth of other strains of this species.
2. 144 strains were examined for their producer characteristics, 134 for their indicator characteristics.
3. Among the 144 strains a producer portion of 38% was found; 76% were shown as indicator. 23% of the strains possessed producer as well as indicator characteristics. Strains sensitive to their own inhibitor were not found.
4. Bacteriophages could be excluded as a cause of growth inhibition.
5. The inhibitors could be divided into three basis types: Type A is activated by trypsin; type B is not influenced by trypsin; and type C is inactivated by trypsin. There are strains which produce only one type, two in any combination, or all three types of inhibitors.
6. An inhibitor of type B was characterized further. It was found to be strongly host-specific, heat-labile, chloroform-stable, and could be sedimented in an ultracentrifuge. These characteristics suggest a large bacteriocin.

7. Inhibitor production and inhibitor sensitivity were shown to be stable markers without exception.
8. With this paper a way was opened for the clarification of the epidemiology of Clostridium difficile with the help of bacteriocin typing.

G. LITERATURANGABEN

1. Al-Jumaili, I.J., M. Shibley, A.H. Lishman, C.O. Record:
Incidence and origin of Clostridium difficile in neonates.
J. Clin. Microbiol. 19, 77 - 78 (1984)

2. Allo, M., J. Silva jr., F.R. Fekety, G.D. Rifkin, H. Waskin:
Prevention of clindamycin-induced colitis in hamsters by Clostridium sordellii antitoxin.
Gastroenterology 76, 351 - 355 (1979)

3. Bartlett, J.G., A.B. Onderdonk, R.L. Cisneros:
Clindamycin-associated colitis in hamsters: protection with vancomycin.
Gastroenterology 73, 772 - 776 (1977)

4. Bauernfeind, A., J.R. Burrows:
Suggested procedure allowing use of plastic petri dishes in bacteriocin typing.
App. Environ. Microbiol. 35, 970 - 973 (1978)

5. Bauernfeind, A., C. Petermüller:
Epidemiological typing of Klebsiella by bacteriocins.
Methods in Microbiology 14, T. Bergan and J.R. Norris (ed.) (1983)

6. Bauernfeind, A., C. Petermüller:
Unveröffentlichte Ergebnisse.

7. Borriello, S.P., P. Honour, F.E. Barclay:
Cross-infection and Clostridium difficile.
Lancet ii, 661 (1982)

8. Borriello, S.P., F.E. Barclay:
Protection of hamsters against Clostridium difficile ileocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains.
J. Med. Microbiol. 19, 339 - 350 (1985)

9. Bradley, D.E.:
Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins.
Bact. Rev. 31, 230 - 314 (1967)

10. Buggy, B.P., K.H. Wilson, F.R. Fekety:
Comparison of methods for recovery of Clostridium difficile from an environmental surface.
J. Clin. Microbiol. 18, 348 - 352 (1983)

11. Burdon, D.W.:
Clostridium difficile: The epidemiology and prevention of hospitalacquired infection.
Infection 10, 203 - 204 (1982)

12. Chang, T.W., M. Lauermann, J.G. Bartlett:
Cytotoxity assay in antibiotic-associated colitis.
J. Infect. Dis. 140, 765 - 770 (1979)

13. Delmee, M., M. Homel, G. Wauters:
Serogrouping of Clostridium difficile strains by slide agglutination.
J. Clin. Microbiol. 21, 323 - 327 (1985)

14. Du Pont, H.L.:
Etiology of antibiotic-associated colitis.
Gastroenterology 75, 913 - 914 (1978)

15. Fekety, F.R.:
Recent advances in management of bacterial diarrhea.
Rev. Infect. Dis. 5, 246 - 257 (1983)

16. Fekety, F.R.:
Antibiotic-associated colitis.
Mediguide® to Infectious Diseases 4, Issue 2 (1984)

17. Fekety, F.R., J. Silva, B. Buggy, H.G. Deery:
Treatment of antibiotic-associated colitis with vancomycin.
J. Antimicrob. Chemother. 14, Suppl. D, 97 -102 (1984)

18. George, W.L., V.L. Sutter, S.M. Finegold:
Toxigenicity and antimicrobial susceptibility of Clostridium difficile, a cause of antimicrobial agent-associated colitis.
Curr. Microbiol. 1, 55 - 58 (1978)

19. George, W.L., R.D. Rolfe, G.K.M. Harding, R. Klein, C.W. Putnam, S.M. Finegold:
Clostridium difficile and cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated pseudomembranous colitis.
Infection 10, 205 -207 (1982)

20. Greenfield, C., A. Burroughs, M. Szawathowski, N. Bass, P. Noone, R. Pounder:
Is pseudomembranous colitis infectious?
Lancet i, 371 - 372 (1981)

21. Gresser, M.E., C.J. Shanholtzer, D.N. Gerding, C.R. Garrett, L.R. Peterson:
Evaluation of the 24 h API 20A Anaerobe System for identification of Clostridium difficile.
J. Clin. Microbiol. 19, 915 - 916 (1984)

22. Harpold, D.J., B.L. Wasilauskas, M.L. O'Connor:
Rapid identification of Clostridium species by high-pressure liquid chromatography.
J. Clin. Microbiol. 22, 962 - 967 (1985)

23. Holst, E., I. Helin, P.A. Mårdh:
Recovery of Clostridium difficile from children.
Scand. J. Infect. Dis. 13, 41 -45 (1981)

24. Honda, T., I. Hernadez, T. Katoh, T. Miwatani:
Stimulation of enterotoxin production of Clostridium difficile by antibiotics.
Lancet i, 655 (1983)

25. Katz, L. J.T. La Mont, J.S. Trier, E.B. Sonnenblick, S.W. Rothman, S.A. Broitman, S. Rieth:
Experimental clindamycin-associated colitis in rabbits. Evidence for toxin-mediated mucosal damage.
Gastroenterology 74, 246 - 252 (1978)

26. Kim, K.H., F.R. Fekety, D.H. Batts, D. Brown, M. Cudmore, J. Silva jr., D. Waters:
Isolation of Clostridium difficle from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis.
J. Infect. Dis. 143, 42 -49 (1981)

27. Larson, H.E., A.B. Price:
Pseudomembranous colitis: Presence of clostridial toxin.
Lancet ii, 1312 - 1314 (1977)

28. Larson, H.E.:
Pseudomembranous colitis is an infection.
J. Infect. 1, 221 - 226 (1979)

29. Levine, H.G., M. Kennedy, J.T. La Mont:
Counterimmunoelectrophoresis vs. cytotoxity assay for the detection of Clostridium difficile toxin.
J. Infect. Dis. 145, 398 (1982)

30. Libby, J.M., T.D. Wilkins:
Production of antitoxins to two toxins of Clostridium difficile and immunological comparison of the toxins by cross-neutralisation studies.
Infect. Immun. 35, 374 -376 (1982)

31. Lyerly, D.M., D.E. Lockwood, S.H. Richardson, T.D. Wilkins:
Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile.
Infect. Immun. 35, 1147 -1150 (1982)

32. Lyerly, D.M., N.M. Sullivan, T.D. Wilkins:
Enzyme-linked immunosorbent assay for Clostridium difficile toxin A.
J. Clin. Microbiol. 17, 72 -78 (1983)

33. Mahony, D.E., A. Li:
Comparative study of ten bacteriocins of Clostridium perfringens.
Antimicrob. Agents Chemother. 14, 886 - 892 (1978)

34. Mahony, D.E., P.D. Bell, K.B. Easterbrook:
Two bacteriophages of Clostridium difficile.
J. Clin. Microbiol. 21, 251 - 254 (1985)

35. Nunez-Montiel, O.L., F.S. Thompson, V.R. Dowell:
Norleucine-tyrosine broth for rapid identification of Clostridium difficile by gas-liquid chromatography.
J. Clin. Microbiol. 17, 382 - 385 (1983)

36. Ogata, S., M. Hongo:
Bacteriophages of the genus Clostridium.
Adv. Appl. Microbiol. 25, 241 - 273 (1979)

37. Rolfe, R.D., S. Helebian, S.M. Finegold:
Bacterial interference between Clostridium difficile and normal fecal flora.
J. Infect. Dis. 143, 470 - 475 (1981)

38. Sell, T.L., D.R. Schaberg, F.R. Fekety:
Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for Clostridium difficile.
J. Clin. Microbiol. 17, 1148 - 1152 (1983)

39. Small, J.D.:
Fatal enterocolitis in hamsters given lincomycin hydrochloride.
Lab. Anim. Care 18, 411 - 420 (1968)

40. Tabaqchali, S., D. Holland, S. O'Farrell, R. Silman:
Typing scheme for Clostridium difficile: Its application in clinical and epidemiological studies.
Lancet i, 935 - 938 (1984)

41. Tagg, J.R., A.S. Dajani, L.W. Wannamaker:
Bacteriocins of gram-positive bacteria.
Bact. Rev. 40, 722 - 756 (1976)

42. Teasley, D.G., D.N. Gerding, M.M. Olson, L.R. Peterson, R.L. Gebhard, M.J. Schwartz, J.T. Lee jr.:
Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for Clostridium difficile-associated diarrhoe and colitis.
Lancet ii, 1043 - 1046 (1983)

43. Tedesco, F.J., C.B. Anderson, W.F. Ballinger:
Drug-induced colitis mimicking an acute surgical condition of the abdomen.
Arch. Surg. 110, 481 - 484 (1975)

44. Toshnival, R., J. Silva jr., F.R. Fekety, K.H. Kim:
Studies on the epidemiology of colitis due to Clostridium difficile in hamsters.
J. Infect. Dis. 143, 51 - 54 (1981)

45. Verschiedene Autoren, u. a. Finney, Riedel, Anschütz, Wertheim. Zitat in Penner A., Bernheim A.:
Acute postoperative enterocolitis. A study on the pathologic nature of shock.
Arch. Pathol. 27, 966 - 983 (1939)

46. Viscidi, R.P., R.H. Yolken, B.E. Laughon, J.G. Bartlett:
Enzyme immunoassay for detection of antibody to toxins A and B of Clostridium difficile.
J. Clin. Microbiol. 18, 242 - 247 (1983)

47. Welch, D.F., S.K. Menge, J.M. Matsen:
Identification of toxigenic Clostridium difficile by counterimmunoelectrophoresis.
J. Clin. Microbiol. 11, 470 - 473 (1980)

48. West, S.E.H., T.D. Wilkins:
Problems associated with counterimmunoelectrophoresis assays for detecting Clostridium difficile toxin.
J. Clin. Microbiol. 15, 347 - 349 (1982)

49. Wilson, K.H., M.J. Kennedy, F.R. Fekety:
Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for Clostridium difficile.
J. Clin. Microbiol. 15, 443 - 446 (1982)

50. Wilson, K.H., J. Silva, F.R. Fekety:
Fluorescent-antibody test for detection of Clostridium difficile in stool specimens.
J. Clin. Microbiol. 16, 464 - 468 (1982)

51. Wilson, K.H., J.N. Sheagren:
Antagonism of toxigenic Clostridium difficile by nontoxigenic Clostridium difficile.
J. Infect. Dis. 147, 733 - 735 (1983)

52. Yolken, R.H., L.S.Withcomb, G. Marien, J.G. Bartlett:
Enzyme immunoassay for the detection of Clostridium difficile antigen.
J. Infect. Dis. 144, 378 (1981)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. A. Bauernfeind danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung und Führung während der Arbeit sowie für die Hilfe bei der Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt, Vorstand des Max von Pettenkofer-Instituts, danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut die Arbeit durchzuführen.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen im Labor von Prof. Bauernfeind für die geduldige technische Anleitung und für ihre stets freundliche Hilfe während meiner Arbeit.

LEBENSLAUF

Geboren:	am 23. April 1960 in Marktoberdorf
Eltern:	Dr. Magnus Klarer Viktoria Klarer, geb. Schmid
Schulbesuch:	1966 - 1970 Grundschule in Lengenwang 1970 - 1978 Gymnasium in Marktoberdorf
Abitur:	Juni 1978
Wehrdienst:	1978 - 1979 in Füssen und Baumholder
Studium:	1979 - 1985 an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fachbereich Tiermedizin
Staatsexamen:	Januar 1985
Approbation:	März 1985
Tierärztliche Tätigkeit:	seit Februar 1985 am Max von Pettenkofer-Institut in München als Doktorand